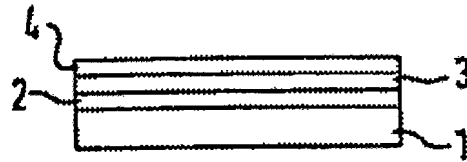


Abstract of EP0197266

A method for analysing sequences of nucleic acids entails the liquid sample which contains denatured nucleic acid being contacted with a light-reflecting support surface which has, chemically bonded to this surface, a nucleic acid strand of defined sequence, where complementary sequences of the denatured nucleic acid in the sample combine by hybridisation with the nucleic acids immobilised on the support, and the thickness of growth of the organic layer forming thereby on the support surface is determined by comparison ellipsometry measurement or the change in the interference patterns on the bilayer reflecting surface.

Fig. 1



Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 86102108.7

51 Int. Cl.⁴: **C 12 Q 1/68**
G 01 N 33/52

22 Anmeldetag: 19.02.86

30 Priorität: 26.02.85 DE 3506703

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
15.10.86 Patentblatt 86/42

84 Benannte Vertragsstaaten:
CH FR GB IT LI SE

71 Anmelder: **SAGAX Instrument AB**
Nytorpsvägen 14
S-183 53 Täby(SE)

72 Erfinder: **Nygren, Hakan**
Valbergsvägen 4 C
S-427 00 Billdal(SE)

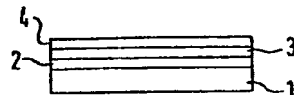
72 Erfinder: **Stenberg, Manne**
Hedelundsvägen 5
S-417 43 Göteborg(SE)

74 Vertreter: **Nöth, Heinz, Dipl.-Phys.**
Patentanwalt Müllerstrasse 1
D-8000 München 5(DE)

54 Verfahren und Träger zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren.

57 Ein Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren, bei dem die zu untersuchende flüssige Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, mit einer lichtreflektierenden Trägeroberfläche in Berührung gebracht wird, die einen an dieser Oberfläche chemisch gebundenen Nucleinsäurestrang mit bestimmter Sequenz aufweist, wobei sich komplementäre Sequenzen der in der Probe befindlichen denaturierten Nucleinsäure mit dem am Träger fixierten Nucleinsäurestrang durch Hybridisierung vereinigen, und das Dickenwachstum der sich dabei auf der Trägeroberfläche bildenden organischen Schicht durch Vergleichsellipsometriemessung oder Änderung der Interferenzerscheinungen an der doppelschichtig ausgebildeten reflektierenden Oberfläche ermittelt wird.

Fig.1



EP 0 197 266 A2

Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren, insbesondere der Desoxy-
ribonucleinsäure (DNA) und der Ribonucleinsäure (RNA), sowie Träger zur
Durchführung des Verfahrens und Verfahren zur Herstellung des Trägers

5 Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist ein doppelsträngiges Molekül mit zwei kom-
plementären Ketten aus den vier Nucleotidbasen Adenin, Cytosin, Guanin
und Thymin. Die beiden Stränge der DNA sind über Wasserstoffbrückenverbindun-
gen miteinander verknüpft, wobei sich bestimmte Basenpaare, nämlich Adenin-
Thymin und Cytosin-Guanin zusammenfinden. Die der DNA verwandte RNA enthält
10 Ribose statt Desoxyribose und Uracil- statt Thyminresten. Die spezielle
DNA-Verknüpfung zu zwei komplementären Ketten führt zu dem genetischen
DNA-Code, welcher die genetische Information in allen lebenden Zellen,
insbesondere der Chromosomen, darstellt. Bekannte Sequenzen von DNA oder
RNA können in der Biotechnologie zur Darstellung der Sequenzen von unbekann-
15 tem genetischen Material oder zu Diagnosezwecken zur Identifizierung geneti-
schen Materials aus Viren und Bakterien verwendet werden. Herkömmliche
Verfahren zur Bestimmung von DNA- oder RNA-Hybridisierung beruhen auf der
Bindung von radioaktiv oder enzymatisch markierten DNA- oder RNA-Sequenzen
an komplementärem, einsträngigem DNA oder RNA und nachfolgender Erfassung
20 der Markierung. Als feste Phasen werden in den meisten Fällen Cellulose
oder andere Polysaccharide zur Immobilisierung von DNA verwendet und wirken
als Rezeptoren für die markierte DNA-Sonde.

Hierzu ist es beispielsweise bekannt, (E. M. Southern, J. Mol. Biol., 98,
25 503, 1975), Fragmente der DNA durch Elektrophorese in Agarosegel zu trennen
und die getrennten Fragmente zu einzelnen Strängen zu denaturieren, welche

durch Diffusion auf Nitrocellulose Teile übertragen werden. Die getrennten Sequenzen werden dann identifiziert durch Inkubation radioaktiv markierter komplementärer Sequenzen, welche an ihre Targets gebunden werden. Das radioaktive Isotop wird dann lokalisiert durch Aktivierung einer photographischen Emulsion. Ferner ist bekannt (B. E. Noyes und G. R. Stark, Cell 5, 301, 1975), zum gleichen Zweck die denaturierte DNA bzw. RNA kovalent an Cellulose mittels einer Diazobenzylgruppe zu binden.

Sequenzen von DNA aus infektiösen Mikroorganismen können als Sonden verwendet werden zur Erfassung von eventuell vorhandener komplementärer DNA in Proben von Serum, Mark, Fäkalstoffen oder dgl. zu Diagnosezwecken. Bislang werden hierzu radioaktiv oder enzymatisch markierte Sonden, die bekannte Nucleinsäuresequenzen aufweisen, verwendet.

Aufgabe der Erfindung ist es demgegenüber, ein Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren sowie einen hierfür verwendbaren Nachweisträger und ein Verfahren zur Herstellung dieses Trägers zu schaffen, bei welchen die Durchführung der Sequenzanalyse von Nucleinsäuren mit unmarkierten Sonden durchgeführt werden kann.

20

Diese Aufgabe wird gelöst durch die kennzeichnenden Merkmale der Ansprüche 1, 7 und 13, wobei in den Unteransprüchen Weiterbildungen der Erfindung gekennzeichnet sind.

Aus der DE-OS 23 30 702 ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine mit Hilfe eines an einen Träger gebundenen Antikörpers bekannt. Im Gegensatz dazu handelt es sich jedoch bei der Erfindung darum, daß eine zu untersuchende Nucleinsäure während der Analyse auf einem festen Träger immobilisiert
5 wird, an den eine Nucleinsäure mit bekannter Sequenz chemisch gebunden ist und das Dickenwachstum der organischen Schicht gemessen wird.

Hierzu wird denaturierte einsträngige DNA bzw. RNA kovalent gebunden auf einer lichtreflektierenden Oberfläche des Trägers, und dieser Träger wird
10 als Nachweismedium mit der zu untersuchenden Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, deren Sequenz zu analysieren ist, in Berührung gebracht. Komplementäre denaturierte Nucleinsäure in der Probe wird an der am Träger vorhandenen, eine bestimmte Sequenz aufweisende einsträngige Nucleinsäure gebunden, wodurch durch optische Messung das Dickenwachstum
15 der sich dabei bildenden organischen Schicht, durch welche insbesondere die Reflexionseigenschaften der reflektierenden Trägersoberfläche verändert werden, nachweisbar ist. Dieser Nachweis kann dadurch erfolgen, daß Änderungen der Lichtpolarisation nach der Reflexion an der Trägersoberfläche oder Änderungen der Interferenzfarben ermittelt werden. Zur Überwachung des
20 Polarisationsverhaltens kann bevorzugt das in der europäischen Patentschrift 19 088 bzw. in der US-PS 43 32 476 beschriebene ellipsometrische Verfahren sowie die dort beschriebene ellipsometrische Vorrichtung zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften der Oberfläche einer Probe verwendet werden.

Für den Nachweis der Änderung der Interferenzfarben des an der Trägersober-
25 fläche reflektierten Lichts infolge der aufgewachsenen organischen Schicht eignet sich ein Trägerkörper, auf dessen reflektierender Oberfläche eine

Doppelschicht, nämlich eine Reflexions-Antireflexionsschicht, vorhanden ist, auf welcher der Nucleinsäurestrang mit der bekannten Sequenz immobilisiert ist. Als derartiger Trägerkörper eignet sich insbesondere ein solcher, wie er in der DE-OS 32 15 484 beschrieben ist.

5

Ein geeigneter Trägerkörper, der bei der durchzuführenden Analyse mit der zu untersuchenden Probe als Nachweismedium in Berührung gebracht wird, besitzt bevorzugt eine Silicium- oder Aluminiumoberfläche, auf der ein Siliciumwasserstoff mit einer funktionellen Gruppe als Schicht aufgebracht ist.

10 An dieser Siliciumwasserstoffschicht wird dann der Nucleinsäurestrang mit der bekannten bzw. bestimmten Sequenz durch chemische Bindung, insbesondere kovalente Bindung, immobilisiert. In vorteilhafter Weise kann noch eine Zwischenschicht aus einem Polysaccharid, insbesondere Dextran, zur Immobilisierung der Nucleinsäure aufgebracht werden.

15

Von Vorteil ist bei der Erfindung, daß die Nucleinsäuresonden, welche die Nucleinsäure mit bekannter Eigenschaft, insbesondere Sequenz, enthalten, für den nachfolgenden Nachweis nicht mehr markiert werden müssen. Es können bei der Erfindung somit bekannte Proben mit unmarkierten Sonden untersucht
20 werden. Der hierzu erforderliche Trägerkörper läßt sich einfach herstellen und besitzt einen einfachen Aufbau. Die Nachweisreaktion läßt sich in einfacher Weise in einem Vergleichsellipsometer, wie es beispielsweise im europäischen Patent 19 088 bzw. in der US-PS 43 32 476 beschrieben ist, durchführen. In dieser Vorrichtung lassen sich komplementäre Sequenzen, die sich
25 an dem auf dem Träger befindlichen Nucleinstrang gebildet haben, visuell sichtbar machen und damit nachweisen und bestimmen. Der Träger wird dabei in der bekannten ellipsometrischen Vorrichtung als Probe eingesetzt. Man

benötigt daher bei der Erfindung einen relativ geringen apparativen Aufbau im Gegensatz zu den bislang bekannten Verfahren.

Die reflektierende Trägeroberfläche besteht bevorzugt aus Siliciumdioxid 5 oder Aluminiumoxid. Auf diese ist eine Schicht eines Siliciumwasserstoffs aufgebracht, der eine funktionelle Endgruppe enthält. Hierfür eignet sich insbesondere eine Amino(NH_2 -) oder eine Epoxy(CH_2 -CH-¹⁰)-Gruppe. Die Bindung der Siliciumwasserstoffschicht an der reflektierenden Oberfläche erfolgt spontan an Silanolgruppen bzw. Aluminiumhydroxylgruppen. Die denaturierte 10 Nucleinsäure (DNA bzw. RNA) mit einer bestimmten bekannten Verknüpfungsfolge werden chemisch, insbesondere kovalent, über eine Diazobenzylgruppe direkt an die Siliciumwasserstoffschicht oder über eine Zwischenschicht aus einem Polysaccharid, beispielsweise Dextran, gebunden.

15 Die Probe wird vor der Analyse denaturiert, beispielsweise in 0,5 M Natriumhydroxid oder dgl. und anschließend neutralisiert, und nachfolgend wird noch ein Hybridisierungspuffer zugegeben, dessen Zusammensetzung eine langsame Verknüpfung der komplementären Nucleinsäurestränge, insbesondere der DNA- bzw. RNA-Stränge ermöglicht. Dieser Puffer kann beispielsweise aus 20 50 % Formamid, 0,05 M Natriumcitrat, 0,1 % Dodecylsulfat, 1 mM EDTA (Ethylen-diamintetraessigsäure) bzw. deren Na-Salz, 0,02 % Albumin und 2 % Dextran-sulfat bestehen. Die Verknüpfung der komplementären Nucleinsäure aus der Probe mit dem kovalent am Träger immobilisierten Nucleinstrang äußert sich im Anwachsen der Dicke der dabei auf der Trägeroberfläche gebildeten organi- 25 schen Schicht. Nach Spülen mit einer Kochsalzlösung und Wasser und anschließendem Trocknen läßt sich die Dicke der aufgewachsenen organischen Schicht,

wie schon erwähnt, mit Hilfe der Vergleichsellipsometrie (US-PS 43 32 476 oder EP 19 088) oder durch Messung der Änderung der Interferenzfarben von aus Siliciumoxiden bestehenden Doppelschichten an reflektierenden Trägerkörpern, wie sie beispielsweise in der DE-OS 32 15 484 beschrieben sind, ermitteln bzw. messen.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele zur Herstellung eines Trägers, welcher als Nachweismedium bei der Sequenzanalyse von Nucleinsäuren verwendet wird, im einzelnen beschrieben. Diese Träger besitzen eine lichtreflektierende Trägeroberfläche, auf welcher die denaturierte DNA oder RNA durch kovalente Bindung aufgebracht ist.

Beispiel 1

Ein Siliciumplättchen oder Glasplättchen bzw. -scheibchen, auf welches Silicium oder Aluminium beispielsweise durch Aufdampfen aufgebracht ist, wird in einem Exsikkator angeordnet, der mit einem Einlaßhahn und einem Auslaßhahn versehen ist. Der Druck im Innern des Exsikkators wird auf etwa 10 mm Hg verringert und die Temperatur auf 80° C gehalten. Ein Kolben, der Epoxysiliciumwasserstoff enthält, wird an den Einlaß des Exsikkators angeschlossen, und der Einlaßhahn am Exsikkator wird geöffnet. Der Siliciumwasserstoff wird dabei auf der Oberfläche des mit Silicium bzw. Aluminium beschichteten Silicium- bzw. Glaskörpers durch Destillation aufgebracht, wobei innerhalb von etwa zwei Stunden eine epoxy-aktivierte Oberfläche entsteht. Die beschichteten Körper werden dann in eine Lösung von 12 % 2-Aminotiophenol in Aceton eingetaucht und über einen längeren Zeitraum, etwa 10 Stunden, in einem Inkubator aufbewahrt. Anschließend werden die beschichteten Körper gewaschen

und bis zu ihrer weiteren Verwendung in Wasser aufbewahrt. Die beschichteten
Körper werden dann in 1 M Salzsäure, welche 250 µg/ml Natriumnitrid aufweist,
eine Stunde bei 4° C eingetaucht, gewaschen und in einer Feuchtekammer auf-
bewahrt. Isolierte reine DNA wird in 25 mM Phosphatpuffer gelöst, auf 90° C
5 erhitzt, ein dem vierfachen Volumen der vorhandenen Lösung entsprechendes
Volumen an Dimethylsulfoxid wird zugesetzt und im Zeitraum von etwa 10 Stunden
tropfenweise auf die Schichtkörperoberfläche aufgebracht und gezüchtet.
Die plättchenförmigen Schichtkörper werden dann wieder gewaschen und in einer
Lösung von Albumin (10 µg/ml) in einem Phosphatpuffer durch Inkubation nach-
10 behandelt, um die Oberfläche für unspezifische Adsorption zu inaktivieren.

Beispiel 2

Die Trägerplättchen werden mit Epoxysiliciumwasserstoff oder Aminosilicium-
15 wasserstoff wie im Beispiel 1 behandelt. Anschließend wird Dextran an die
epoxy- bzw. aminoaktivierte Oberfläche durch Inkubation in einer 20 %-Lösung
von Dextran in Wasser gebunden. Hierdurch entsteht ein 20 bis 40 Å dicker
Überzug aus Dextran auf der Oberfläche. Alternativ hierzu kann Dextran durch
Inkubation mit 0,01 % Natriumperjodat bei pH 8,0, welches in einer Sepha-
20 dex-G25-Säule entsalzt ist, auf der mit Aminosiliciumwasserstoff beschichteten
Oberfläche während etwa 10 Stunden gezüchtet werden. Das gebundene Dextran
wird dann stabilisiert durch Inkubation mit einer 0,1 %igen Natriumborhydrid-
lösung in 0,1 M Acetatpuffer bei pH 5,0. Anschließend wird 0,1 M Natrium-
hydroxid (10 ml) und 1,4 Butandiol diglycidylether (1 ml) auf die platten-
25 förmigen Trägerkörper im Zeitraum von etwa 10 Stunden aufgebracht, und an-
schließend wird ebenfalls in einem Zeitraum von etwa 10 Stunden 12 % 2-Amino-

thiophenol in Aceton den Trägerplättchen zugegeben. Die Trägerplättchen werden dann in Wasser aufbewahrt. Isolierte und reine DNA oder RNA wird dann nach einer Nitridbehandlung der Platten wie im Beispiel 1 auf die Trägerplättchen aufgebracht.

5

Beispiel 3

Die Trägerplättchen werden mit einer 20 bis 40 Å dicken Schicht aus Dextran, wie im Beispiel 2 beschrieben, beschichtet. Die mit Dextran beschichteten
10 Trägerplättchen werden dann zur Inkubation mit einer Lösung aus 0,2 g Natriumacetat in Wasser (10 ml), welches auch 1 g 1-((m-Nitrobenzyloxy)methyl)pyridiniumchlorid behandelt, anschließend in einem Ofen bei 70° C getrocknet und dann bei 140° C während etwa einer Stunde gebacken. Die Trägerplättchen werden dann zur Inkubation in einer 20 %igen Lösung von Natriumdithionid
15 behandelt und mit Wasser gewaschen. Ferner werden dann die Trägerplättchen in 1 M Salzsäure, welche 250 µg/ml Natriumnitrid aufweist, etwa eine Stunde lang bei 4° C eingetaucht, gewaschen und in einer Befeuchtungskammer aufbewahrt. Abschließend wird dann isolierte, reine DNA bzw. RNA gelöst und durch Züchtung, wie im Beispiel 1 beschrieben, auf die vorstehend behandelten
20 Trägerplättchen aufgebracht.

Im folgenden werden anhand der beiliegenden Figuren Ausführungsbeispiele für bei der Sequenzanalyse von Nucleinsäure verwendbaren Trägern beschrieben.

25 Bei den in den Figuren 1 bis 3 dargestellten Ausführungsbeispielen handelt es sich um schematische Darstellungen der in Form von Plättchen ausgebildeten

Träger, wobei lediglich die Reihenfolge der Anordnung der einzelnen Schichten auf dem Grundkörper veranschaulicht werden soll, ohne daß die Verhältnisse der Schichtdicken der dargestellten Schichtdicken den in der Praxis vorhandenen Maßstäben entsprechen.

5

In der Fig. 1 befindet sich auf einem Trägergrundkörper 1, der beispielsweise aus Silicium oder Glas bestehen kann, eine Siliciumdioxidschicht 2, welche auch eine Aluminiumoxidschicht sein kann, die als reflektierende Oberfläche wirkt. Auf dieser Schicht befindet sich eine Schicht 3 aus Silicium-
10 wasserstoff mit funktionellen Epoxy- oder Aminogruppen. Darüber befindet sich die Schicht 4, in welcher die auf dem Träger immobilisierte bzw. fixierte einsträngige Nucleinsäure, beispielsweise DNA, vorhanden ist.

Das Ausführungsbeispiel des in der Fig. 2 dargestellten Trägers entspricht
15 im wesentlichen dem in der Fig. 1 und unterscheidet sich demgegenüber lediglich dadurch, daß zwischen der Siliciumwasserstoffschicht 3 und der Schicht 4 mit der fixierten denaturierten einsträngigen Nucleinsäure eine Polysaccharidschicht 5, insbesondere aus Dextran, angeordnet ist.

20 Bei dem in der Fig. 3 dargestellten Ausführungsbeispiel ist die reflektierende Oberfläche zweischichtig ausgebildet, wobei die auf dem Grundkörper 1 aufliegende erste Schicht 2' aus Siliciummonoxid und die zweite Schicht 2 aus Siliciumdioxid besteht. Die Wirkungsweise dieser Doppelschicht ist im einzelnen in der DE-OS 32 15 484 beschrieben.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäure, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Ribonucleinsäure (RNA), bei dem die zu untersuchende Nucleinsäure während der Analyse auf einem festen Träger immobilisiert wird, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die
5 zu untersuchende flüssige Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, mit einer lichtreflektierenden Oberfläche des Trägers, an den ein Nucleinsäurestrang mit bestimmter Sequenz chemisch gebunden ist, in Berührung gebracht wird, wobei sich komplementäre Sequenzen der in der Probe vorhandenen denaturierten Nucleinsäure mit dem an der Trägeroberfläche
10 vorhandenen Nucleinsäurestrang durch Hybridisierung vereinigen, und daß das Dickenwachstum der sich dabei auf der Trägeroberfläche bildenden organischen Schicht optisch bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
15 n e t , daß das Dickenwachstum aus den Änderungen der Reflexionseigenschaften der reflektierenden Trägeroberfläche bestimmt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
n e t , daß das Dickenwachstum durch ellipsometrische Messung bestimmt
20 wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
n e t , daß das Dickenwachstum durch Interferenzmessung bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
n e t , daß das Dickenwachstum durch Vergleichsellipsometriemessung be-
stimmt wird.
- 5 6. Verfahren nach Anspruch 4, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
n e t , daß das Dickenwachstum aus Interferenzänderungen bei der Reflexion
von Licht an einer reflektierenden Oberfläche, die eine aus Siliciumoxid
und Siliciumdioxid bestehende Doppelschicht aufweist, bestimmt wird.
- 10 7. Träger zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1
bis 6, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Trägerober-
fläche lichtreflektierend ausgebildet ist, und der eine bestimmte Sequenz
aufweisende Nucleinsäurestrang durch chemische Bindung an der Trägerober-
fläche haftet.
- 15
8. Träger nach Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß der Nucleinsäurestrang durch kovalente Bindung an der Trägeroberfläche
haftet.
- 20 9. Träger nach Anspruch 7 oder 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
n e t , daß der Trägerkörper aus Silicium oder Glas besteht.
10. Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 9, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß der Trägerkörper an seiner lichtreflektie-
25 renden Oberfläche eine Siliciumdioxid- oder Aluminiumoxidschicht auf-

weist, auf der eine Schicht aus funktionellem Siliciumwasserstoff sich befindet, an welchem der Nucleinsäurestrang kovalent gebunden ist.

11. Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 10, d a d u r c h g e -
5 k e n n z e i c h n e t, daß der Nucleinsäurestrang über eine Polysaccharidzwischen-
schicht an der reflektierenden Trägeroberfläche kovalent gebunden ist.

12. Träger nach Anspruch 10, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
10 n e t, daß der Siliciumwasserstoff als funktionelle Gruppen Amino- oder Epoxygruppen aufweist.

13. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach Anspruch 7, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß ein eine funktionelle Gruppe
15 aufweisender Siliciumwasserstoff auf die reflektierende Oberfläche des Trägers aufdestilliert wird und anschließend darauf der Nucleinsäurestrang aus einer Pufferlösung, in welcher die reine Nucleinsäure gelöst ist, gezüchtet wird.

20 14. Verfahren nach Anspruch 13, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
n e t, daß vor dem Aufbringen des Nucleinsäurestrangs auf die aktivierte Siliciumwasserstoffs-
schicht durch Züchtung aus einer wäßrigen Lösung eine Polysaccharidschicht aufgebracht wird.

M 17.03.88

0197266

1/1

Fig.1

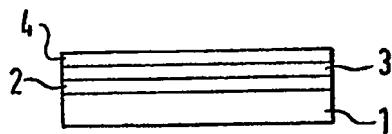


Fig.2

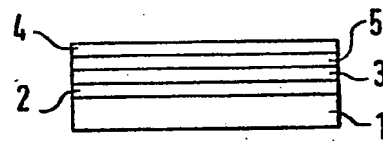


Fig.3

